

左归降糖舒心方对高脂饮食 MKR 小鼠糖脂代谢及炎症反应的影响

成细华¹, 喻 嵘^{2*}, 黄政德¹, 吴勇军¹, 伍参荣¹

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学 中西医结合临床重点学科, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 探讨左归降糖舒心方对高脂饮食转基因 2 型糖尿病 MKR 小鼠糖脂代谢及炎症反应的影响。方法 用左归降糖舒心方干预治疗高脂饮食转基因 2 型糖尿病 MKR 小鼠, 采用电化学法测定空腹血糖浓度, 采用全自动生化分析仪检测血脂和炎症因子超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP), 采用 ELISA 法检测血清胰岛素与肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平。结果 高脂饲料喂养的 MKR 小鼠空腹血糖高于 MKR 组, 但无统计学意义 ($P>0.05$); 血清胰岛素、血脂 (TC、LDL-C、HDL-C)、血清 hs-CRP 和 TNF- α 水平高于 MKR 组 ($P<0.01$), 而三酰甘油 (TG) 下降, 低于 MKR 组 ($P<0.01$)。经左归降糖舒心方或文迪雅干预治疗后, 除左归降糖舒心方低剂量组血糖和 hs-CRP 下降不显著 ($P>0.05$), 其他各组 MKR 小鼠血糖、血清胰岛素、TG、血清 hs-CRP 和 TNF- α 水平显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01), TC 和 LDL-C 下降无统计学意义 ($P>0.05$); 左归降糖舒心方高剂量组 HDL-C 显著上升 ($P<0.01$), 而文迪雅组升高不显著 ($P>0.05$)。左归降糖舒心方作用呈剂量依赖性。结论 左归降糖舒心方能调节高脂饮食 MKR 小鼠糖脂代谢、减少炎症因子的产生、保护血管、降低糖尿病并发血管病变的风险。

关键词: 左归降糖舒心方; 2 型糖尿病; MKR 小鼠; 糖脂代谢; 炎症因子; 高脂饮食

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0546-04

Effect of Zuogui Jiangtang Shuxin Recipe on glucose-lipid metabolism and inflammatory cytokines in high-fat diet MKR mice

CHENG Xi-hua¹, YU Rong², Huang Zheng-de¹, WU Yong-jun¹, WU Cen-rong¹

1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Key Disciplines of Clinic Integration of Chinese Medicine and Western Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Key words: Zuogui Jiangtang Shuxin Recipe (ZJSR); type 2 diabetes; MKR mice; glucose-lipid metabolism; inflammatory cytokines; high-fat diet

2 型糖尿病及其血管并发症系临床多发, 且严重危害人类健康, 影响生存质量的疾病。高脂饮食是急剧恶化糖尿病患者体内糖脂代谢、胰岛素抵抗 (高胰岛素血症) 和炎症反应的重要因素^[1], 增加 2 型糖尿病患者血管并发症的发生率。左归降糖舒心方 (由熟地黄、山茱萸、川芎、藿香、胆南星等 9 味中药组成) 为基础方左归复方的增减方, 对血管内皮细胞具有保护作用^[2-3]。MKR 鼠为转基因 2 型糖尿病小鼠, 与正常小鼠相比, 其在出生后 5 周左右即可表现为显著的肌肉、肝脏、脂肪组织的胰岛

素抵抗, 糖耐量异常, 胰岛 β 细胞功能紊乱以及游离脂肪酸、三酰甘油 (TG) 的脂代谢紊乱, 肝脏 TG 堆积等糖尿病症状^[4-7], 可以作为理想的糖尿病动物模型。本研究以 MKR 鼠为模型, 研究左归降糖舒心方对高脂饮食 MKR 鼠糖脂代谢、血清胰岛素及炎症因子超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平的影响, 为左归降糖舒心方的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物与饲养环境

收稿日期: 2010-05-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30973749); 湖南省自然科学基金杰出青年基金 (08JJ1005); 湖南省中医药科研基金重点项目 (20090003); 湖南省高校创新平台开放基金 (09K059); 湖南省科技厅资助项目 (2009SK3118); 中西医结合临床重点学科资助项目

作者简介: 成细华 (1974—), 女, 湖南湘乡人, 副教授, 博士, 从事中医药防治糖尿病的机制研究。

Tel: 13787418152 E-mail: chengxihua0309@yahoo.com.cn

*通讯作者 喻 嵘 Tel: (0731)88458072 E-mail: yuron@21cn.com

MKR 小鼠(纯合子,采用组织特异性过度表达转基因技术产生),由美国国立卫生研究院 Dr. D. LeRoith 提供,经自然交配后繁殖的子代用于本实验。小鼠饲养在湖南中医药大学 SPF 级试验动物中心,饲养笼具、垫料、饲料、饮水均按 SPF 级试验动物的要求进行制备与消毒。

1.2 药物

左归降糖舒心方中的各组方中药购自湖南中医药大学杏林药号,由湖南中医药大学附属第一医院王宇红教授鉴定为正品。制备方法:按水提醇沉法制备粗提物,精制后喷雾干燥得粉末,用前以蒸馏水配成生药 1 g/mL。文迪雅,葛兰素史克(天津)有限公司,批号 08030009。

1.3 高脂饲料

基础饲料加 15%猪油,1%胆固醇,0.05%牛黄胆酸钠。

1.4 试剂

末端全血葡萄糖测试条(北京怡成生物电子技术有限公司,批号 20080424);小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒(ADL 公司,产品号 QRCT-301330013013 EIA\UTL);TNF- α ELISA 试剂盒(ADL 公司,产品号 QRCT-3013321033221EIA\UTL)。

1.5 主要仪器

怡成超越 JPS—III 型血糖测试仪,北京怡成生物电子技术有限公司提供;日立 7150 全自动生化分析仪,日本日立;酶标仪,奥地利生产。

2 方法

2.1 MKR 小鼠高脂饮食模型的建立及药物干预

60 只经遗传鉴定^[4]的 MKR 小鼠,8 周龄时根据性别、体质量分组,随机分为 MKR 组, MKR 高脂组,左归降糖舒心方高、中、低剂量(49.92、24.96、12.48 g/kg)组和文迪雅(0.52 g/kg)组。除 MKR 组外,其他各组动物均以高脂饲料喂养,连续 8 周;MKR 组以基础饲料喂养,实验过程中无小鼠死亡。高脂饲料喂养 4 周后,各给药组按相应剂量 ig 给药, MKR 组给予等体积蒸馏水,容量为 0.5 mL/20 g,每日定时给药 1 次,连续给药 30 d。末次给药后 0.5 h,心脏取血,分离血清,-20℃冰箱保存备用。

2.2 指标检测

2.2.1 血糖测定 实验结束前小鼠禁食不禁水 5 h 后,小鼠尾静脉取血,以血糖测试仪测定空腹血糖浓度。

2.2.2 血脂和 hs-CRP 测定 总胆固醇(TC)、TG、

高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和 hs-CRP,均采用全自动生化仪进行测定,由湖南中医药大学第一附属医院协助完成。

2.2.3 血清胰岛素和 TNF- α 测定 采用双抗体夹心 ELISA 法,操作严格按照试剂盒说明进行。

2.3 统计学处理

多组计量资料数据采用 One-way ANOVA 进行处理分析,方差不齐采用非参数检验。数据采用 SPSS15.0 软件处理。

3 结果

3.1 左归降糖舒心方对 MKR 高脂小鼠血糖及胰岛素的影响

与 MKR 小鼠相比较, MKR 高脂组空腹血糖浓度升高,但无统计学意义($P>0.05$),胰岛素水平显著升高($P<0.01$),说明高脂饮食诱导 MKR 小鼠产生了胰岛素抵抗。除左归降糖舒心方低剂量组降血糖作用不显著($P>0.05$)外,左归降糖舒心方中、高剂量组和文迪雅组能显著降低高脂饲料喂养的 MKR 小鼠的血糖浓度和胰岛素水平($P<0.05$ 、 0.01),且左归降糖舒心方剂量依赖性,结果见表 1。

3.2 左归降糖舒心方对 MKR 高脂小鼠血脂的影响

与 MKR 组比较, MKR 高脂组 TG 显著下降($P<0.01$),TC、LDL-C 和 HDL-C 显著升高($P<0.01$)。与 MKR 高脂组比较,左归降糖舒心方高剂量组和文迪雅组 TG 下降显著($P<0.05$ 、 0.01);TC 和 LDL-C 下降不显著($P>0.05$);左归降糖舒心方高剂量组 HDL-C 显著升高($P<0.01$),而文迪雅组无统计学意义($P>0.05$),结果见表 2。

表 1 左归降糖舒心方对高脂饮食 MKR 小鼠空腹血糖及血清胰岛素的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of ZJSR on fasting blood sugar and serum insulin in MKR mice treated with high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	空腹血糖/ (mmol·L ⁻¹)	胰岛素/ (ng·mL ⁻¹)
MKR	—	8.94±1.71	6.060±0.310**
MKR 高脂	—	9.66±1.46	20.888±1.141
左归降糖舒心方	12.48	8.85±1.42	15.770±1.534*
	24.96	7.73±0.92*	10.420±1.112**
	49.92	7.07±0.89**	3.650±0.562**
文迪雅	0.52	8.04±1.23*	3.540±0.575**

与 MKR 高脂组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下表同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs MKR high lipid group, same as following tables

3.3 左归降糖舒心方对 MKR 高脂小鼠炎症因子的影响

与 MKR 组比较, MKR 高脂组血清 hs-CRP 和 TNF- α 水平显著升高 ($P<0.01$)。与 MKR 高脂组

比较, 除左归降糖舒心方低剂量组下调 hs-CRP 不显著外 ($P>0.05$), 左归降糖舒心方中、高剂量组和文迪雅组 hs-CRP 和 TNF- α 水平均显著下降 ($P<0.01$)。左归降糖舒心方组呈剂量依赖性。结果见表 3。

表 2 左归降糖舒心方对 MKR 高脂小鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of ZJSR on blood-fat in MKR mice treated with high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
MKR	—	1.75±0.28**	2.15±0.53**	0.164±0.051**	1.711±0.277**
MKR 高脂	—	0.62±0.13	4.28±1.01	1.611±0.706	2.260±0.442
左归降糖舒心方	12.48	0.55±0.21	4.21±0.94	1.601±0.729	2.425±0.445
	24.96	0.51±0.15	4.11±0.95	1.563±0.714	2.617±0.428
	49.92	0.42±0.09**	3.92±0.42	1.542±0.623	2.930±0.459**
文迪雅	0.52	0.51±0.12*	4.23±0.89	1.481±0.543	2.620±0.398

表 3 左归降糖舒心方对 MKR 高脂小鼠血清炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of ZJSR on serum inflammatory cytokines in MKR mice treated with high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	hs-CRP/(mg·L ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
MKR	—	0.140±0.108**	265.44±8.26**
MKR 高脂	—	0.190±0.213	731.43±28.84
左归降糖舒心方	12.48	0.170±0.121	278.79±7.98**
	24.96	0.150±0.139**	194.29±8.27**
	49.92	0.130±0.113**	123.28±7.32**
文迪雅	0.52	0.150±0.168**	144.31±9.62**

4 讨论

MKR 小鼠为转基因 2 型糖尿病小鼠, 可自发形成 2 型糖尿病。给 MKR 小鼠喂食高脂饲料, 进一步加剧了 MKR 小鼠糖脂代谢紊乱。本研究结果显示, MKR 高脂小鼠空腹血糖浓度、血清胰岛素和血脂 (TC、HDL-C 和 LDL-C) 高于 MKR 小鼠, 说明高脂饮食可使血液中胆固醇来源增多, 使 TC 在血中的量升高。LDL-C 升高与动脉硬化的发生密切相关^[8]。TC 升高可能促使 HDL-C 被动升高, 以转运血中的胆固醇, 起到自身保护的作用^[8]。MKR 高脂组血脂 TG 反而低于 MKR 小鼠 ($P<0.05$), 推其原因可能与肝细胞受损 (脂肪肝), 合成极低密度脂蛋白的能力下降相关^[9]。左归降糖舒心方治疗后, MKR 高脂小鼠血糖、血胰岛素和 TG 下降显著, TC 和 LDL-C 下降不明显, 但 HDL-C 升高具有统计学意义, 说明左归降糖舒心方减轻了胰岛素抵抗, 下调血糖浓度, 使保护动脉粥样硬化的保险因子

HDL-C 升高, 加速胆固醇向肝脏转运, 减轻胆固醇对血管壁的损伤。

近年来有观点认为, 糖尿病及其血管病变是炎症性疾病, 这种炎症反应被认为是一种亚临床炎症, 是处在感染性和自身免疫性炎症水平以下的炎症, 这种炎症反应进一步导致胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞损伤和血管内皮细胞功能紊乱, 从而对糖尿病及其慢性血管并发症的发生发展起着重要作用^[4]。大量研究证明, 高脂饮食导致血液炎症因子水平升高^[10]。CRP 是对各种急性损伤、感染或其他炎症刺激的急性反应产物, 与动脉粥样硬化的发生密切相关^[11-12]。血液中 TNF- α 也参与动脉粥样硬化的形成与发展^[4,13]。高脂饮食引起 2 型糖尿病 MKR 小鼠严重的糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗, 进而影响其血液中炎症因子的水平。与 MKR 小鼠比较, MKR 高脂小鼠血清 hs-CRP 和 TNF- α 显著升高, 说明高脂饮食加剧了前炎症因子的产生, 引起内皮损伤。左归降糖舒心方下调 MKR 高脂小鼠血清中 hs-CRP 和 TNF- α 水平, 减少了炎症因子对血管内皮细胞和胰岛细胞的损伤, 减缓了糖尿病血管并发症的发生。

本课题组在前期临床研究与临床文献调研中认为 2 型糖尿病中医的主要病理机制为气阴两虚, 夹瘀血热毒 (虚、瘀、毒), 并据此以滋阴益气、活血解毒立法组成的左归系列方分别用于 2 型糖尿病及其合并症的防治, 已取得较好疗效^[14-17]。本研究在前期研究的基础上, 给 MKR 小鼠高脂饮食, 以基础方左归复方的增减方左归降糖舒心方对高脂饮食 MKR 小鼠进行干预治疗, 进一步证实左归降糖舒心方能使高脂饮食 MKR 小鼠血糖和 TG 下降,

HDL-C 升高,同时降低了血清中炎症因子的水平,增强外周组织对胰岛素的敏感性,减轻了高脂饮食加重的 MKR 小鼠的胰岛素抵抗。通过左归降糖舒心方的干预治疗,保护了血管内皮细胞免受损伤,降低了糖尿病血管并发症发生的风险。本研究为临床有效的左归系列加减方针对不同并发症的治疗作用提供了实验依据。

参考文献

- [1] 梁红艳. 浅谈饮食治疗及健康教育对糖尿病患者的重要性 [J]. 中华现代护理学杂志, 2008, 12(5): 1128-1129.
- [2] 喻 嵘, 陈大舜. 左归丸加减方对试验性糖尿病大鼠降糖作用的试验研究 [J]. 中国中医药科技, 2000, 7(3): 157-159.
- [3] 喻 嵘, 陈大舜, 梅志刚, 等. 左归双降方对葡萄糖、胰岛素、低密度脂蛋白诱导损伤的血管内皮细胞 ICAM-1、tPA、PAI 的影响 [J]. 中医药学刊, 2005, 23(1): 61-63.
- [4] 喻 嵘, 成细华, 胡 伟, 等. 骨骼肌特异性胰岛素样生长因子 1 及胰岛素双受体功能缺失鼠糖尿病及其相关炎症因子的变化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(45): 9075-9078.
- [5] Fernandez A M, Dupont J, Farrar R P, et al. Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 347-355.
- [6] Toyoshima Y, Gavrilova O, Yakar S, et al. Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(9): 4024-4035.
- [7] Kim H, Pennisi P, Zhao H, et al. MKR mice are resistant to the metabolic actions of both insulin and adiponectin: discordance between insulin resistance and adiponectin responsiveness [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(2): E298-E305.
- [8] 张惠美. 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化病人血清中 LDL-C-C 与 HDL-C-C 及 TG 水平检测及其临床意义 [J]. 中华腹部疾病杂志, 2005, 5(3): 174-175.
- [9] 范建高, 曾民德. 脂肪性肝病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [10] 王 斌, 管思明, 李西栋. 微米复方黄连制剂对高脂饮食喂养家兔炎症因子表达的影响 [J]. 中成药, 2008, 30(1): 128-130.
- [11] 石 萍, 孙文字, 杨 敏. CRP、IL-6、TNF- α 与移植动脉硬化早期发病的关系 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2008, 46(3): 58-62.
- [12] Woodman R J, Chew C T, Watts C F. Mechanisms, significance and treatment of vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus: focus on lipid-regulating therapy [J]. *Drugs*, 2005, 65(1): 31-74.
- [13] Gore E, Foster S, Hazen-Martin D, et al. Immunohistochemical analysis of CTGF, TGF- β & TGF- β receptors in the remnant kidney model of chronic renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(3): 528-534.
- [14] 成细华, 喻 嵘, 吴勇军, 等. 左归复方对 MKR 转基因 2 型糖尿病鼠 PPAR γ 表达的影响 [J]. 中药新药与临床研究, 2009, 20(2): 111-115.
- [15] 成细华, 喻 嵘, 吴勇军, 等. 左归复方对 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠糖代谢和抗氧化应激的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1675-1678.
- [16] 喻 嵘, 陈大舜, 梅志刚, 等. 左归双降方对葡萄糖、胰岛素、低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞损伤的干预作用 [J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(1): 17-19.
- [17] 成细华, 喻 嵘, 吴勇军, 等. 左归降糖舒心方对转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠心肌损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 343-345.